DOI:10.11931/guihaia.gxzw201905006

北部湾徐闻海域红树内生细菌物种多样性及其杀线虫活性研究

李蜜，候师师，银江林，何宇铭，刘永宏，易湘茜*
（广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院， 南宁 530200）

摘要：对北部湾徐闻海域红树植物内生细菌的分布特征、物种多样性及其杀线虫活性进行分析，为研究新型微生物杀虫剂提供菌种资源。本次实验从徐闻县采集 7 种红树植物共 16 份样品，设计 10 种分离培养基，使用稀释涂布法分析红树植物内生细菌的分布特征。通过 16S rRNA 分子生物学方法，对内生细菌进行多样性分析探讨内生细菌的物种多样性。利用秀丽隐杆线虫模型，通过杀线虫活性实验测试内生细菌乙酸乙酯提取物的杀线虫活性。研究结果表明，从 16 份植物各组织器官中获得 33 株内生细菌，分布于 19 个科 23 个属，其中芽孢杆菌属（*Bacillus*）为优势菌属，获得 8 株潜在的新种或新属。同时，筛选到 2 株具有显著杀线虫活性的菌株，半数致死浓度（LC_{50}）分别为 28.63 mg mL^{-1} 和 178.03 mg mL^{-1}。研究结果证实了徐闻海域红树具有多样性丰富的内生细菌，同时部分细菌具有较强的杀线虫活性，具有发现新型微生物杀虫剂的潜力。

关键词：内生细菌，红树林，物种多样性，杀线虫活性
中图分类号：R946　　　　　　　　**文献标识码：**A

Study on diversity and nematicidal activity of endophytic bacteria from mangrove plants collected from Beibu Gulf coast at Xuwen

Li Mi, Hou Shishi, Yin Jianglin, He Yuming, Liu Yonghong, Yi Xiangxi*
（*Institute of Marine Drugs /Faculty of Pharmacy*, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: To study the distribution, diversity and nematicidal activity of endophytic bacteria from mangrove plants collected from Beibu Gulf coast at Xuwen. It can provide bacterial resources for the microbial insecticides. The bacteria were isolated from sixteen samples seven mangrove plants which collected from the Xuwen by designed 10 kinds of isolation medias. The 16S rRNA molecular biology method, dilution coating method and *Caenorhabditis elegans* screening model were used to explore the diversity and nematicidal activity of endophytic bacteria isolated from mangrove plants. The results showed that 33 endophytic bacteria were isolated by 16 organs and tissues which could be classified into 19 families and 23 genera and the dominant genus were *Bacillus*. The eight potential new species or genera were obtained. Through the nematicidal activity test obtained 2 kinds of activity bacteria. Two endophytic bacterial had the extremely significant nematicidal activities and the lethal

---

基金项目：国家自然科学基金（21662006, 41566004）；广西自然基金面上项目（2018GXNSFAA281268）；广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目（2018006）；广西中医药大学 2017 年引进博士科研启动基金项目（2017BS039）；广西中医药大学海洋药物研究院团队科研专项经费项目（2018ZD005-A06）
[Supported by the National Natural Science Foundation of China (21662006, 41566004); Guangxi Natural Fund General Project (2018GXNSFAA281268); Development Program of High-level Talent Team under Qihuang Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2018006); Research Launching Fund Project from Guangxi University of Chinese Medicine Introduced the Doctoral in 2017 (2017BS039); Special Program for Scientific Research Project under Institutes of Marine Drugs of Guangxi University of Chinese Medicine（2018ZD005-A06）]。

作者简介：李蜜(1995-)，女，广西柳州人，主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究，（E-mail）18878552446@163.com。
***通信作者：**易湘茜，博士，副教授，硕士生导师，主要从事海洋生物资源应用研究，（E-mail）42672960@qq.com。

concentration of 50% was 28.63 mg mL^{-1} and 178.03 mg mL^{-1}, respectively. The research confirm that mangrove plants collected from the Xuwen are rich in endophytic bacteria. At the same time, parts of the bacteria have strong nematicidal activity, which could be a potential source for the discovery of the new microbial insecticides.

Key words: endophytic bacteria, mangrove plants, species diversity, nematicidal activity

红树林生态系统（mangrove ecosystems）主要包括种类丰富的动物群落、红树木本植物群落和微生物群落（Chen et al., 2009）。红树林环境中的微生物能够耐高盐和酸性等环境，因而其在物种、基因组成和生态功能上形成了多样性差异。仝林燕等（2011）从湛江红树林海域采集泥土样品 550 份，共分离到 195 株放线菌，其中从三种红树植物白骨壤、桐花树、木榄的根际土壤中分离到 110 株放线菌。许敏等（2016）从 11 份广东湛江红树林植物样品中共得到 159 株放线菌，分布于 12 个科 19 个属，其中链霉菌属为优势菌属。陈振明等（2006）从湛江海域红树林植物中发现 9 株细菌对番茄有促进生长的作用，4 株细菌能抑制生长。Liu et al.,（2010）采用 PCR-DGGE 方法和 DGGE 指纹图谱对福建省九龙江口福工红树林区的微生物群落结构及基因多样性进行分析，发现红树林区细菌多样性远大于非红树林区域。我国广东湛江红树林国家级自然保护区呈带状散布于雷州半岛沿海滩涂，主要由高桥、特呈岛、徐闻等组成（许敏等，2016）。关于该海域红树林微生物多样性研究多集中于高桥镇（许敏，2015；许敏等，2016），徐闻沿北部湾海域研究报道并不多见，因此开展红树林内生细菌多样性研究具有重要意义，值得我们进一步探索。

目前，根结线虫病严重危害着我国乃至全世界的农作物，使作物受到不同程度的侵害。据报道，我国每一种粮食、蔬菜以及经济作物都至少被一类植物线虫残害（蔚应俊，2006）。世界范围内，线虫病害占植物病害的15~20%，由此造成经济损失可达1570亿美元（Abad et al., 2008）。因此，安全防控线虫的病害成为目前急需解决的关键问题。已有学者从红树林环境中筛选到具有杀线虫活性的微生物。王帅等（2018）筛选到一株可杀死南方根结线虫的生防真菌Snef 21命名为聚多曲霉A（*spergillus sydowii*）其发酵液对卵囊孵化抑制效果较好，相对抑制率分别为44.1%与50.6%。有学者还从红树林放线菌分离到具有杀线虫活性的阿扎霉素(azalomycin)类化合物（Xu et al., 2014）。为此，本实验以湛江徐闻海域红树植物为研究对象，分析红树植物内生细菌的多样性及筛选杀线虫活性，以期发现细菌新物种及杀线虫活性菌株，为新型微生物杀虫剂的发现奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品采集：2017 年 7 月 14 日在广东徐闻县迈陈镇的红树林（经纬度为 109º59′14″ E、20º20′12″ N）采集到海莲（*Bruguiera sexangula*）、红海榄（*Rhizophora stylosa*）、桐花树（*Aegiceras corniculatum*）、海漆（*Excoecaria agallocha*）、黄槿（*Hibiscus tiliaceus*）、阔苞菊（*Pluchea indica*）、白骨壤（*Avicennia marina*）7 种红树植物的根茎叶样品 16 份，具体信息如表 1 所示。收集无病虫害的新鲜并带枝叶的植株以及一部分植物根部，用无菌水冲洗样品表面泥沙及残留物，装入采样袋进行密封保存，置于采样冰盒中尽快拿回实验室进行后期处理。

线虫材料来源：本实验所使用的野生型秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）和 OP50 尿嘧啶缺陷型大肠杆菌（*Escherichia coli*）均由广西科学院汪斌博士提供。

表 1 样品采集信息

Table 1 Information of collected samples

样品编号 Number of samples	植物种类 Plant species	采集部位编号 Number of collect tissue

A	海莲 *Bruguiera sexangula*	A-1 A-2 A-3
B	桐花树 *Aegiceras corniculatum*	B-1 B-2 B-3
C	红海榄 *Rhizophora stylosa*	C-1, C-2
D	海漆 *Excoecaria agallocha*	D-1 D-3
E	黄槿 *Hibiscus tiliaceus*	E-2 E-3
F	阔苞菊 *Pluchea indica*	F-2 F-3
G	白骨壤 *Avicennia marina*	G-2 G-3

注：**1**. 根，**2**. 茎，**3**. 叶。

Note：**1**. Root, **2**. Stem, **3**. Leaf.

1.2 细菌分离

1.2.1 分离及纯化培养基

分离培养基：采用 10 种分离培养基对红树植物内生细菌进行分离，分别为 AGG（改良的高氏培养基）、M4（海藻糖-天冬酰胺培养基）、M5（海藻糖-脯氨酸培养基）、M7（改良 ISP5 培养基）、M9（精氨酸-天冬酰胺培养基）、M10（改良淀粉-水解酪素培养基）、ISP7（酪氨酸-天冬酰胺培养基）、ISP3（燕麦培养基）、ISP4（无机盐-淀粉琼脂培养基）、R2A（R2A 琼脂培养基）。详细配方见参考文献（李菲等, 2016）。培养基中添加重铬酸钾和制霉菌素抑制真菌生长，终浓度分别为 25 mg L^{-1} 和 50 mg L^{-1}。待培养基温度降至 50 ℃左右时加入抑制剂，混匀倒于培养皿中制成固体培养基。

纯化及保藏培养基：改良 ISP2 固体培养基，配方为酵母提取物 2.0 g，麦芽提取物 2.0 g，葡萄糖 2.0 g，琼脂粉 15.0 g，30 g 的海盐和 1 000 mL 去离子水。

发酵培养基：改良 ISP2 液体培养基，培养基配方同改良 ISP2 固体培养基，但不加入琼脂粉。

1.2.2 红树植物样品的处理

采集的红树植物于无菌操作台中选取完整无病虫害的根、茎和叶不同组织部位。参考李家怡等（2017）用 5%次氯酸钠溶液浸泡 8 min，无菌水冲洗残余液体；75%的酒精溶液浸泡 5 min，无菌水冲洗至无酒精味。

取已处理的不同部位红树植物样品大约 2 g 于研钵充分研磨，2 mL 无菌水与研磨样品充分混匀；取 1 mL 该浓度液作为样品原液，再依次稀释到 10^{-3} 和 10^{-4} 组织悬液，当做涂布的样液，置于 4 ℃冰箱暂存。

1.2.3 菌株的分离纯化及保藏

取上述组织悬液 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液 0.2 mL，分别涂布于 10 种分离培养基上，倒置放置于 28 ℃恒温培养箱培养 2-8 周。通过形态观察挑取形态各异的单菌落使用改良 ISP2 固体培养基进行分离纯化，通过三区划线纯化，获得纯净的单菌落，并记录菌落数及菌落的形态特征。将纯化好的纯菌株用竹签刮取对数生长期的菌体，于 20%(V/V)无菌甘油管中制成菌悬液于-80 ℃超低温冰箱保藏。

1.2.4 16S rRNA 基因序列分析

菌株基因组 DNA 的提取采用 Chelex-100 树脂法（周双清等，2010），选取纯化好的菌株，用无菌竹签挑取芝麻粒大小的菌体加入装有 50 μL Chelex-100 树脂的八连管中，用竹签充分搅拌使菌体与树脂混匀，进行 PCR 梯度扩增。

PCR 梯度扩增参照 Walsh et al.（1991）方法，扩增引物使用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测，Bio-RAD 凝胶成像仪观察电泳目标条带的有无来作为判断基因组 DNA 提取是否合格，检验合格后将 PCR 产物送至上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司进行测序。测序结果经 DNA Star 软件整理，利用数据库 EzBioCloud（https://www.ezbiocloud.net/）（Kim et al., 2009）进行在线比对；对 16S rRNA 基因序列进行相似性比对搜索，从中选取相似性较高且是有效描述的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象。

1.3 杀线虫活性测试

1.3.1 细菌发酵粗提物的制备

参考李飞娜等（2017）及覃媚等（2016）的方法，将对数生长期的细菌接种于 200 mL 改良 ISP2 液体培养基中，于 180 r min^{-1} 28 ℃摇床发酵 7 d，合并发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取，取乙酸乙酯层利用旋转蒸发仪浓缩至浸膏状后备用，收集粗提物置干燥器中 4 ℃低温保存。

1.3.2 细菌代谢产物的杀线虫实验

参考许敏等（2016）的方法，用红树内生细菌发酵液乙酸乙酯粗提物进行杀线虫活性实验，用公式线虫致死率(%)=线虫死亡数/线虫总数×100%计算线虫致死率，以线虫致死率>50%为阳性结果。

（1）线虫产卵培养：将秀丽隐杆线虫线挑至新鲜的已加有 OP50 的 NGM 培养基（Brenner., 1974）中进行产卵培养，镜检培养皿产卵较多时收集线虫。

（2）线虫的同步化：将线虫用 M9 缓冲液进行冲洗，于 3 000 r min^{-1} 离心 1 min 弃去上清液。加入三倍体积的裂解液，上下颠倒震荡约 5 min，使线虫表皮破裂，释放虫卵，以保证线虫裂解充分，于 3 000 r min^{-1} 离心 1 min，弃去上清。再加入 2 mL M9 缓冲液冲洗，将裂解得到的虫卵加至涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上，置于 28 ℃生化培养箱内培养 36 h 左右，即可得到处于同一龄期的线虫，用于杀线虫活性实验。

（3）杀线虫活性实验：依次在 96 孔板中每孔加入含线虫 M9 缓冲液约 20 μL(约每 20 μL 20 条)，再加入 5 μL 甲醇溶解的细菌发酵液粗提物（浓度 500 μg·mL^{-1}），用 M9 缓冲液补足至 100 L 后，置于 20 ℃培养箱中培养，24 h 后在体式显微镜下观察并记录线虫总数和死亡数。虫体僵直，震荡 30 s 仍僵直判定为线虫死亡。设置 1 μg·mL^{-1} 阿维菌素阳性组和 5%的甲醇溶液阴性组对照。

（4）线虫半数致死浓度(LC_{50} 值)的测定：加入 75 μL M9 缓冲液至 96 孔板，同时加入 20 μL 的线虫(每 20 μL20 条)。采用倍半稀释法，将 2 株活性菌株 IMDGX 4744 和 IMDGX 4303 的乙酸乙酯提取浓缩物分别用甲醇稀释成 10 个浓度梯度，取各个浓度 5 μL 加入 96 孔板，置于 20 ℃，培养 24 h 后观察并统计。采用 Probit 法（贾春生，2006）分别计算 2 株活性菌株的 LC_{50} 值。

1.4 统计分析

线虫寿命数据采用 SPSS Statistics 21.0 进行统计分析，本文中所有图表均采用 Excel 2013 软件，细菌的 16S rRNA 基因序列利用 DNA Star 软件进行整理。

2 结果与分析

2.1 红树植物内生细菌多样性分析

如表 3 所示，共分离得到 157 株内生细菌，隶属于 6 个纲 13 个目 19 个科 23 个属。其中芽孢杆菌属（*Bacillus*）共分离到 33 株，占分离总菌数的 20.38%，为此次分离内生细菌的优势菌群。肠杆菌属（*Enterobacter*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）均分离得到 21 株细菌，均占总菌数的 13.4%，泛菌属（*Pantoea*）得到 20 株，占分离总菌数的 12.7%。不同样品其优势菌群存在差异，其中，海莲（*B. sexangula*）优势菌群为芽孢杆菌属（15），桐花树（*A. corniculatum*）分离到假单胞菌属 10 株，红海榄（*R. stylosa*）获得 6 株无色杆菌属（*Achromobacter* sp.,）由此可见，从总的菌株数量来看优势菌群为芽孢杆菌属，而不同样品分离得到的优势菌群不同。通过 16S rRNA 基因序列比对排重，最终获得 33 株内生细菌。

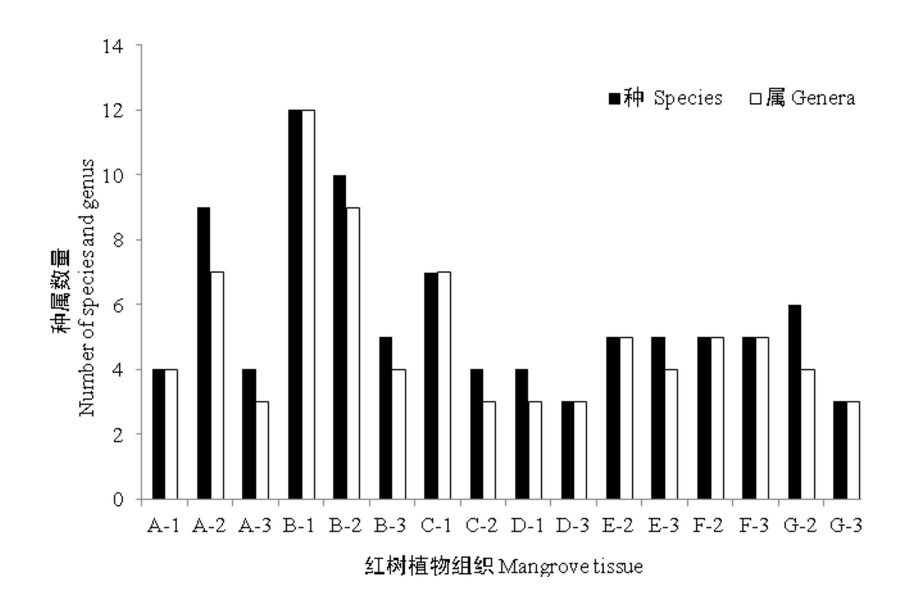
根据 16S rRNA 基因序列相似性小于 98.65%的菌株属于潜在新物种的归类原则（Kim M., 2014），由表 2 可知 33 株内生细菌中存在 8 株潜在的新种或者新属。菌株 IMDGX 4649 *Actinomycetospora* sp., IMDGX 4744 *Altererythrobacter* sp., IMDGX 4908 *Asaia* sp., IMDGX 4645 *Aurantimonas* sp., IMDGX 4737 *Myxococcus* sp., IMDGX 4088 *Pacificimonas* sp., IMDGX 4145*Paracoccus* sp., IMDGX 4725 *Pseudomonas* sp., 分别与有效发表菌株 *Actinomycetospora chiangmaiensis*, *Altererythrobacter marensis*, *Asaia siamensis*, *Aurantimonas coralicida*, *Myxococcus fulvus*, *Pacificimonas aurantium*, *Paracoccus aestuarii*, *Pseudomonas mendocina* 的最高相似度分别为 97.92%，97.76%，97.74%，98.03%，97.92%，97.53%，97.38%，97.82%可能为潜在的新物种。

2.2 红树植物内生菌种属数量分布

各样品分离到的细菌物种及属的数量分布如图 1 所示。7 种红树植物中桐花树样品分离到最多的内生细菌，共 19 株隶属于 16 个属，其次是海莲得到 13 株内生细菌隶属于 10 个属，依次为红海榄和阔苞菊均为 10 株，海漆和白骨壤均为 7 株，黄槿分离到 6 株。不同红树部位内生菌多样性亦存在差异，桐花树中分离得到的细菌种属数量依次是根＞茎＞叶，根得到的种属数量最多远大于茎及叶。红海榄、海漆和白骨壤分离得到的细菌种属数量根＞茎。黄槿和阔苞菊所得菌株数量差异不大，茎和叶的菌株数量基本保持一致。而海莲的茎中获得的菌株种属数量最多，根及叶基本保持相同数量的种属。由此可见，大部分植物分离得到的细菌种属数量根＞茎＞叶，此结果与诸多学者得到的成果一致，内生细菌主要来源于植物的根部（Zhao et al.，2011；魏玉珍等，2010），而部分植物组织器官可培养内生细菌多样性存在较大的差异，可能是采集红树的时间季节，所处的环境及样品运输的破坏程度有关（解修超，2007），具体原因还有待进一步研究探讨。

2.3 不同培养基分离效果的差异

不同成分的培养基可以满足不同微生物的营养需求，培养基营养成分的差异严重影响微生物的生长。由图 2 和表 2 可知，R2A 琼脂培养基分离得到的细菌种属数量最多获得 27 株细菌隶属 15 个种 11 个属，其培养基主要成分包括酵母浸出物，蛋白胨，酪蛋白水解物，葡萄糖，可溶性淀粉等。其次是 M9 精氨酸-天冬酰胺培养基分离得到 24 株 11 个种隶属 8 个属。M7 改良 ISP5（主要成分为酵母粉和 L-天冬酰胺）和 P7 酪氨酸-天冬酰胺培养基分别得到 22 株 9 个种隶属 7 个属和 16 株 9 个种隶属 8 个属。表 2 可知，*Achromobacter* 属可从 AGG、M10、M4、M5 和 M7 培养基中分离得到。本次分离得到的 *Bacillus*（芽孢杆菌属）、*Pantoea dispersa*、*Enterobacter xiangfangensis* 和 *Pseudomonas psychrotolerans* 菌株在大多部分培养基中均能较好的生长。但是仍然存在很多菌株只能在一种培养基中分离得到，如菌株 *Actinomycetospora chiangmaiensis*、*Altererythrobacter marensis*、*Asaia siamensis*、*Exiguobacterium profundum* 和 *Micromonospora sediminicola* 等，因此在进行细菌纯化时建议使用相对应的分离培养基。



注：**A-G**. 具体信息见表 1。**1.** 根，**2.** 茎，**3.** 叶。

Note: **A-G**. Information in the table 1. **1.** Root, **2**. Stem , **3**. Leaf.

图 1 不同红树植物组织分离得到的内生细菌种属

Fig. 1 Endophytic bacteria species isolated from different mangrove tissue

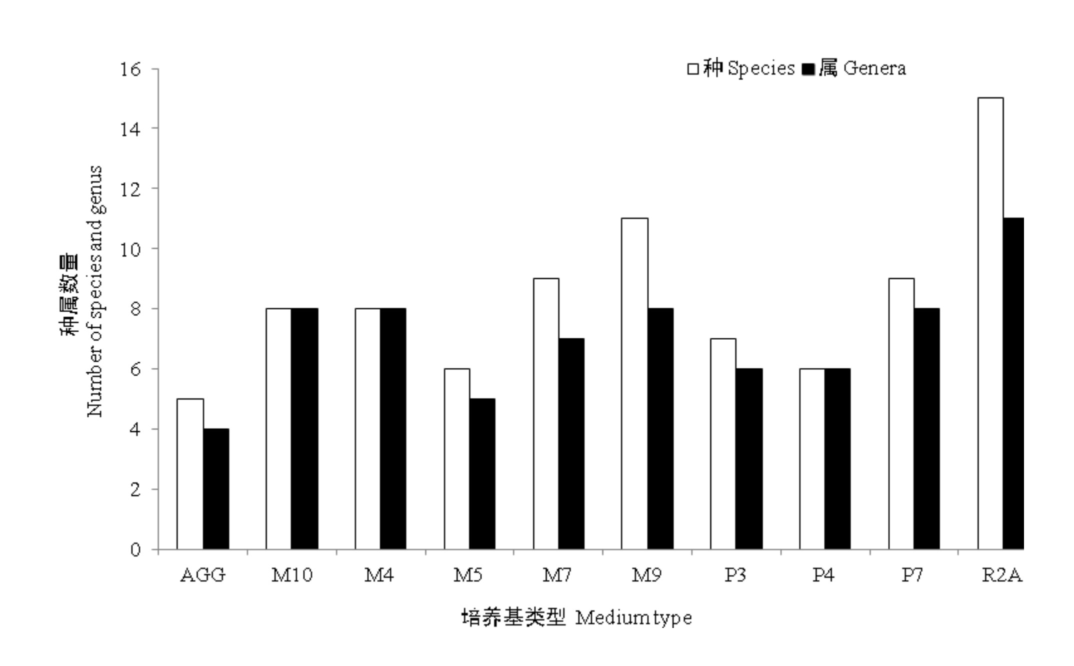


图 2 不同培养基分离得到的内生细菌

Fig. 2 Endophytic bacteria isolated from different media

表 2 可培养内生细菌在不同培养基中的分布

Table 2 Distribution of cultivable endophytic bacteria in different culture medium

菌株编号	参比菌种	培养基类型 Medium type									
Strain code	Reference strains	AGG	M10	M4	M5	M7	M9	P3	P4	P7	R2A
IMDGX 4143	*Achromobacter denitrificans*	1	1	1	2	3					
IMDGX 4385	*Achromobacter marplatensis*	1									
IMDGX 4138	*Achromobacter ruhlandii*					1					
IMDGX 4270	*Acinetobacter junii*			1							
IMDGX 4649	*Actinomycetospora chiangmaiensis*									1	
IMDGX 4744	*Altererythrobacter marensis*									1	
IMDGX 4908	*Asaia siamensis*								1		
IMDGX 4850	*Swaminathania salitolerans*							1			
IMDGX 4645	*Aurantimonas coralicida*								1	4	
IMDGX 4146	*Bacillus altitudinis*						2			1	
IMDGX 4827	*Bacillus paralicheniformis*					1					
IMDGX 4062	*Bacillus siamensis*	1	4			1	2	4		3	2
IMDGX 4763	*Bacillus zhangzhouensis*				1	5	1	2	1		6
IMDGX 4277	*Bacillus tequilensis*										1
IMDGX4827-1	*Cedecea lapagei*							1			
IMDGX 4075	*Enterobacter xiangfangensis*	3	2	2	1	1	7	3	3	1	1
IMDGX 4491	*Exiguobacterium profundum*		1								
IMDGX 4787	*Micromonospora sediminicola*										1
IMDGX 4737	*Myxococcus fulvus*			1							2
IMDGX 4910	*Nocardiopsis synnemataformans*		2				1				1
IMDGX 4088	*Pacificimonas aurantium*										1
IMDGX 4776	*Pantoea dispersa*	1	2	1	2	6	2	1	3	2	1

IMDGX 4145	*Paracoccus aestuarii*								1	
IMDGX 4756	*Paracoccus homiensis*	1	1			1				
IMDGX 4725	*Pseudomonas mendocina*			2						
IMDGX 4379	*Pseudomonas parafulva*					1				1
IMDGX 4767	*Pseudomonas psychrotolerans*	1	1	5	2	2	2		2	2
IMDGX 4528	*Pseudoxanthomonas spadix*				1	3				2
IMDGX 4651	*Salinicola salarius*					1				
IMDGX 4664	*Stakelama pacifica*		1							
IMDGX 4090	*Staphylococcus epidermidis*				1		1			6
IMDGX 4926	*Stenotrophomonas maltophilia*							1		
IMDGX 4650	*Thalassospira povalilytica*					1				

表 3 33 株可培养内生细菌的物种组成

Table 3 Species of 33 cultivable endophytic bacteria

菌株编号 Strain code	参比菌种 Reference strains	相似性 Similarity (%)	来源 Origin	属 Genera	不同红树分离的细菌数量 Number of bacteria isolates from different mangrove							总计 Total
					A	B	C	D	E	F	G	
IMDGX 4143	*Achromobacter denitrificans*	99.87	B-1、B-2、B-3、C-1、C-2	无色杆菌属 *Achromobacter*	1	1	6	1			1	10
IMDGX 4385	*Achromobacter marplatensis*	99.47	G-3									
IMDGX 4138	*Achromobacter ruhlandii*	99.74	A-3									
IMDGX 4270	*Acinetobacter junii*	99.43	B-3 和 F-3	不动杆菌属 *Acinetobacter*		2				2		4
IMDGX 4649	*Actinomycetospora chiangmaiensis*	97.92	B-1	放线孢菌属 *Actinomycetospora*	1	1					2	4
IMDGX 4744	*Altererythrobacter marensis*	97.76	A-2	*Altererythrobacter* 菌属	1							1
IMDGX 4908	*Asaia siamensis*	97.74	C-1	*Asaia* 菌属			1					1
IMDGX 4850	*Swaminathania salitolerans*	98.07	A-1									
IMDGX 4645	*Aurantimonas coralicida*	98.03	B-1、B-3 和 F-1、F-3	橙单胞菌属 *Aurantimonas*		6				1		7
IMDGX 4146	*Bacillus altitudinis*	99.74	B-2 和 G-2									
IMDGX 4827	*Bacillus paralicheniformis*	99.83	F-2									
IMDGX 4062	*Bacillus siamensis*	99.87	G-1、A-1、A-2、A-3、C-1、C-2、C-3、D-2、D-3	芽孢杆菌属 *Bacillus*	15	3	3	3		2	6	32
IMDGX 4763	*Bacillus zhangzhouensis*	100.00	A-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3、C-1、C-2、C-3、D-2、D-3									
IMDGX 4277	*Bacillus tequilensis*	99.87	A-2 和 F-2									

IMDGX4827-1	*Cedecea lapagei*	98.63	C-1	柠檬酸杆菌属 *Citrobacter*			1					1
IMDGX 4075	*Enterobacter xiangfangensis*	99.87	A-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3、C-1、C-2、C-3、D-2、D-3、E-2、E-3、F-2、F-3、G-2、G-3	肠杆菌属 *Enterobacter*	3	2	1	4	6	2	3	21
IMDGX 4491	*Exiguobacterium profundum*	99.74	B-1	微小杆菌属 *Exiguobacterium*		2						2
IMDGX 4787	*Micromonospora sediminicola*	100.00	E-3	小单孢菌属 *Micromonospora*	1							1
IMDGX 4737	*Myxococcus fulvus*	97.92	A-2 和 F-2	粘球菌属 *Myxococcus*	2					1		3
IMDGX 4910	*Nocardiopsis synnemataformans*	99.74	A-1、A-2 和 G-1、G-2	拟诺卡氏菌属 *Nocardiopsis*	2						2	4
IMDGX 4088	*Pacificimonas aurantium*	97.53	B-1	*Pacificimonas* 菌属		1						1
IMDGX 4776	*Pantoea dispersa*	100.00	B-1、B-2、B-3、E-1、E-2、E-3、G-1、G-2、G-3	泛菌属 *Pantoea*	1	4	2	1	4	2	6	20
IMDGX 4145	*Paracoccus aestuarii*	97.38	B-2	副球菌属 *Paracoccus*	3	1				1		5
IMDGX 4756	*Paracoccus homiensis*	100.00	A-2、A-3 和 F-2、F-3									
IMDGX 4725	*Pseudomonas mendocina*	97.82	A-2	假单胞菌属 *Pseudomonas*	4	10		1	5	1		21
IMDGX 4379	*Pseudomonas parafulva*	100.00	A-2 和 F-2									
IMDGX 4767	*Pseudomonas psychrotolerans*	100.00	A-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3、D-1、D-2、D-3、E-1、E-2、E-3									
IMDGX 4528	*Pseudoxanthomonas spadix*	99.10	B-1、B-2、B-3、C-1、C-2、C-3、D-1、D-2、D-3、F-1、F-2、F-3	假黄色单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*		1	1	2	2			6

IMDGX 4651	*Salinicola salarius*	99.74	B-1	*Salinicola* 菌属	1						1
IMDGX 4664	*Stakelama pacifica*	98.80	B-2	*Stakelama* 菌属	1						1
IMDGX 4090	*Staphylococcus epidermidis*	100.00	B-1、B-2、B-3、E-1、E-2、E-3、F-1、F-2、F-3	葡萄球菌属 *Staphylococcus*	2	1		2	1		7
IMDGX 4926	*Stenotrophomonas maltophilia*	99.61	B-1、B-2、C-1、C-2 和 F-1、F-2	寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*	1	1			1		3
IMDGX 4650	*Thalassospira povalilytica*	100.00	B-1	*Thalassospira* 菌属	1						1

2.4 红树植物内生细菌发酵产物的杀线虫活性分析

内生细菌发酵产物的杀线虫活性测试结果如表 4 所示。其中，细菌代谢粗提物中致死率高于 50%的阳性菌株有 2 株 IMDGX 4744 和 IMDGX 4725，其致死率分别为 59.09%和 78.95%。IMDGX 4744 和 IMDGX 4725 的致死率曲线如图 3 和 4 所示，LC_{50} 值分别为 178.03 mg mL^{-1} 和 28.63 mg mL^{-1}。

表 4 内生细菌代谢产物的杀线虫活性

Table 4 Nematicidal activity of the extracts from endophytic bacteria

菌株编号 Strain code	致死率 Fatality rate（%）	菌株编号 Strain code	致死率 Fatality rate（%）
5%甲醇(阴性对照) Methanol（Negative control）	4.50	IMDGX 4725	78.95
1 μg • mL^{-1} 阿维菌素（阳性对照） Abamectin（Positive control）	15.00	IMDGX 4075	10.00
IMDGX 4767	14.29	IMDGX 4737	4.76
IMDGX 4776	9.09	IMDGX 4062	10.00
IMDGX 4650	9.52	IMDGX 4146	13.64
IMDGX 4744	59.09	IMDGX 4910	9.09
IMDGX 4850	45.00	IMDGX 4138	4.76
IMDGX 4528	30.00	IMDGX 4908	5.56
IMDGX 4827	10.00	IMDGX 4143	4.76

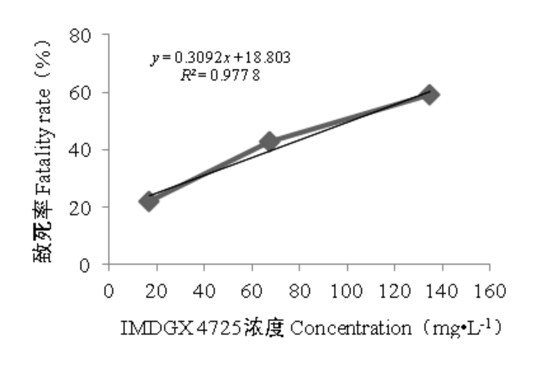


图 3 IMDGX 4725 发酵产物的致死率曲线

Fig. 3 Mortality curve of the IMDGX 4725

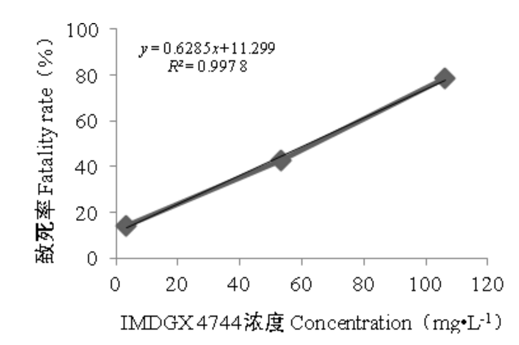


图 4 IMDGX4744 发酵产物的致死率曲线

Fig. 4 Mortality curve of the IMDGX 4744

3 讨论

红树林受周期性潮汐影响，其营养物质变化较大，微生物资源丰富。大量研究表明，红树林生境可培养内生细菌多样性远大于非红树林生境。为了解广东徐闻海域红树植物可培养内生细菌的物种组成及分布，课题组从徐闻海域采集到7种红树植物16份组织器官，利用10种培养基，从中分离内生细菌资源。研究结果表明，从中分离获得32株内生细菌，隶属于19科23属，其中芽孢杆菌属为优势菌属，此外获得8株相似性小于98.46%的潜在新种或新属，多样性较为丰富。近年来，关于红树植物内生菌株多样性的研究报道逐渐增多，目前国内外已有大量文献报道红树内生菌株的多样性。吴越等（2017）从7份广西北仑河口红树林植物根际土壤样品中分离得到110株放线菌，分布于7个目9个科15个属。Hong et al.,（2009）使

用11个选择性分离培养基从中国8个地区的红树林土壤和红树植物中分离到2 000多株放线菌，鉴定获得237 株，分布于5个目7个科10个属，分离到的放线菌具有较强的抗菌和抗肿瘤活性。魏玉珍等（2009）从沿北部湾山口海域的红树林采集到10种真红树植物和5种半红树植物并从中分离得到77株细菌。由此可见，红树林微生物资源丰富，具有从中发现活性新化合物的潜力。

据文献报道，红树植物内生菌具有良好的抗菌（吴越等，2017）、抗病毒（李菲等，2016）、杀虫（许敏等，2016）及抗肿瘤（Hong et al., 2009）等生物活性。许敏等（2016）前期从湛江高桥海域筛选到三株具有杀线虫活性的链霉菌，其LC_{50}值分别为83.2、132和138 mg mL^{-1}。课题组此次从徐闻海域分离到的32株内生细菌中筛选到2株具有杀线虫活性。活性菌株IMDGX 4744和IMDGX 4725 分别从海莲的茎和叶子中分离到，分别隶属于*Altererythrobacter*属和*Pseudomonas*（假单胞菌属）LC_{50}值分别为178.03和28.63 mg mL^{-1}。与许敏等（2016）研究结果相比，不同海域的不同菌株可筛选到相同活性且LC_{50}值存在差异，*Altererythrobacter*属、*Pseudomonas*（假单胞菌属）和链霉菌属菌株均具有较强的杀线虫活性。关于筛选到的2株活性细菌的杀线虫活性在本研究中进行了首次报道，具有进一步开发成为新型微生物杀虫剂的潜力。由此可见，湛江沿北部湾海域红树植物内生细菌多样性较为丰富，具有从中挖掘杀线虫活性菌株的潜力。

本次实验设计十种分离培养基对红树内生细菌进行多样性筛选，从R2A培养基中获得最多菌株，其次是M9精氨酸-天冬酰胺培养和M7改良ISP5培养基。三种培养基中R2A和M7均含有酵母浸出物，M9和M7均含L-天冬酰胺。由此可见，微生物生长需要提供相应的氮源和氨基酸以供其营养需求，所以在今后设计红树林生境微生物分离培养基的同时，可以适当考虑增加或者使用不同的氮源和氨基酸。湛江沿北部湾海域红树植物内生细菌资源丰富，且部分菌株具有较强的杀线虫活性，对于寻找新型微生物杀虫剂具有重要意义，同时对于我国红树林植物资源的保护与红树植物内生细菌药用资源的深入开发具有重要的促进作用。

参考文献：

ABAD P, GOUZY J, AURY JM, et al., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode Meloidogyne incognita[J]. Nat Biotechnol, 26(8): 909.

BRENNER S, 1974. The genetics of *Ceanorhabditis elegans*[J]. Genetics, 77(1): 71-94.

CHENG YS, GAN XH, WU ZX, et al., 2001. Present The mangrove on the cost of guangdong[J]. Prot For Sci Technol, 46 (1): 32-35. [陈远生, 甘先华, 吴中亨, 等, 2001. 广东省沿海红树林现状和发展[J]. 防护林科技, 46 (1): 32-35.]

CHEN ZM, HE JJ, HE H, et al., 2006. Isolation and screening of endophytic antifungal bactetia mangroves[J]. Microbiol, 33(3): 18-23. [陈振明, 何进坚, 何红, 等, 2006. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选[J]. 微生物学通报, 33(3): 18-23.]

CHEN L, WANG W, ZHANG Y, et al., 2009. Recent progresses in mangrove conservation, restoration and research in China[J]. J Plant Ecol, 2(2): 45-54.

HONG K, GAO AH, XIE QY, et al.,2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. Mar Drug, 7(1): 24-44

HOLGIUN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y, 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview[J]. Biol Fetil Soil, 33 (04): 265-278.

JIE XC, 2007. Isolation and identification of the endophytic acti-nomycetes from mangrove and isolation and identification of the bioactive metabolites of two marine *Streptomyces*[D]. Trop Agric Univ S Chin: 28-31. [解修超, 2007. 红树植物内生放线菌的分离鉴定和 2 株海洋链霉菌活性代谢产物的分离鉴定[D]. 华南热带农业大学: 28-31.]

JIA CS, 2006. Calculatiang the LC_{50} of insecticides with software SPSS[J]. Chin Bull Entomol, 43(3): 414-417. [贾春生, 2006. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC_{50} [J]. 应用昆虫学报, 43(3): 414-417.]

KIM KH, ROH SW, CHANG HW, et al., 2009. *Nitratireductor basaltis* sp. nov. isolated from black beach sand[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 59(1): 135-8.

LI F, GAO C H, ZHU L B, et al., 2016. Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea[J]. Acta Microb Sin, 56(4): 689-697. [李菲, 高程海, 竺利波, 等, 2016. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性[J]. 微生物学报, 56(4): 689-697.]

LI JY, ZHOU WH, LI F, et al., 2017. Diversity of cultivated marine bacteria and antibacterial activity of endophytic bacterial in Rhizophora stylosa[J]. Guihaia, 37(3): 308-314. [李家怡, 周文红, 李菲, 等, 2017. 红海榄内生细菌多样性及其抑制鱼类致病菌活性研究[J]. 广西植物, 37(3) : 308－314.]

LIU J, MA K M, QU L Y, 2018. Heavy metal pollution assessment and source analysis in the water of Zhanjiang mangrove swamp[J]. J Hydroecology, 39(1):23-31.[刘静, 马克明, 曲来叶, 2018. 湛江红树林湿地水体重金属污染评价及来源分析[J]. 水生态学杂志, 39(1):23-31.]

LIU H, YANG C, TIAN Y, et al., 2010. Analysis of microbial community structure in mangrove sediments by PCR-DGGE technique[J]. Acta Microbiol Sin, 50(7): 923-930.

LI F, GAO CH, ZHU LB, et al., 2016. Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea[J]. Acta Microb Sin, 56(4): 689-697. [李菲, 高程海, 竺利波,等. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 689-697.]

LEI JC, LI CH, HUANG HQ, et al., 2007. Screening of Marine *Actinomycetes* With Nematicidal Activity and the Identification of Strain HA07011[J]. Biotechnol Bull, (6): 146-149. [雷敬超, 李传浩, 黄惠琴, 等, 2007. 杀线虫海洋放线菌的筛选及菌株 HA07011 的鉴定[J]. 生物技术通报, (6): 146-149.]

LIU FF, 2012. Study of the tidal-flat area mangrove bacterial diversity from Zhanjiang[D]. Guangdong Ocean Univ. [刘菲菲. 湛江红树林滩涂海洋细菌多样性的研究[D]. 广东海洋大学, 2012.]

LI FN, PAN Z, TUO L, et al., 2017. Studies on the diversity and novelty of endophytic actinobacteria isolated from mangrove plants collected in Macao [J]. Chin J Antibiot, 42(4): 284-293. [李飞娜, 潘臻, 庹利, 等, 2017. 澳门红树林植物内生放线菌多样性及新颖性研究[J]. 中国抗生素杂志, 42(4): 284-293.]

QIN M, YU QW, ZHU LB, et al., 2016. Diversity of epiphytic bacteria of three species of gracilaria and their bacteriostatic activities[J]. J S Agric, 47(11): 1966-1973. [覃媚, 于清武, 竺利波, 等, 2016. 三种江蓠共附生细菌多样性及抑菌活性分析[J]. 南方农业学报, 47(11), 1966-1973.]

TONG L Y, 2011. Isolation and identification of actinomycetes from the soil of root system of mangrove forest in Zhangjiang[D]. Guangdong ocean Univ. [仝林燕, 2011. 湛江红树林滩涂放线菌的分离鉴定[D]. 广东海洋大学.]

WU Y, LI XJ, CHEN JH, et al., 2017. Diversity and antimicrobial activity of actinobacteria isolated from mangrove rhizosphere soil in Beilun Estuary, Guangxi [J]. Chin J Antibiot, 42(04): 302-310.[吴越, 李小俊, 陈建宏, 等, 2017. 广西北仑河口红树林植物根际土壤放线菌多样性及抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 42(04): 302-310.]

WANG S, GUO LY, ZHU XF, et al., 2018. Toxicity of fungus snef 210 against Meloidogyne incognita in tomato [J]. Plant Protec, 44(06): 55-60.[王帅, 郭龙玉, 朱晓峰, 等, 2018. 聚多曲霉 Snef210 对南方根结线虫毒性的研究[J]. 植物保护, 44(06): 55-60.]

WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 10(4): 506-513.

WEI YJ, 2006. Control of wheat nematode diseases[J]. Mod Agric Sci Technol, (8): 67-67. [蔚应俊, 2006. 小麦线虫病害的防治[J]. 现代农业科技, (8): 67-67.]

WEI YZ, ZHANG YQ, ZHAO LL, et al., 2010. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic

actinobacteria from mangroves at Shankou of Guangxi Province[J]. Microbiology, 37(6):823-828. [魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等, 2010. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 微生物学通报, 37(6): 823-828.]

WEI YZ, ZHAO LL, LI QP, et al., 2009. Isolation and activity screening of endophytic bacteria from mangrove in shankou guangxi[C]. Establishment meetacad semin microbiol resour committee Chin soc microbiol. [魏玉珍, 赵莉莉, 李秋萍, 等, 2009. 广西山口红树林内生菌的分离及生理活性筛选[C]. 中国微生物学会微生物资源专业委员会成立大会暨学术研讨会.]

XU M, 2015. Study on diversity and bioactivity of actinobacteria isolated from mangrove plants collected from Zhanjiang in Guangdong Province[D]. Guilin med univ. [许敏, 2015. 广东湛江红树植物内生放线菌资源勘探及生物活性研究[D]. 桂林医学院.]

XU DB, YE WW, HAN Y, et al., 2014. Natural Products from Mangrove Actinomycetes[J]. Mar Drug, 12(5):2590-2613.

XU M, LI J, DAI SJ, et al., 2016. Study on diversity and bioactivity of actinobacteria isolated from mangrove plants collected from Zhanjiang in Guangdong Province[J]. Chin J Antibiot, 41(01): 26-34. [许敏, 李静, 戴素娟,等,2016. 广东湛江红树林植物内生放线菌资源勘探及生物活性研究[J].中国抗生素杂志, 41(01): 26-34.]

ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. A rapid method for extracting DNA from a ctinomycetes by chelex-100 [J]. Biotechnol Bull, (2): 123-125. [周双清, 黄小龙, 黄东益, 等, 2010. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, (2): 123-125.]

ZHAO K, PENTTINEN P, GUAN T, et al., 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China[J]. Curr Microbiol, 62:182-190.